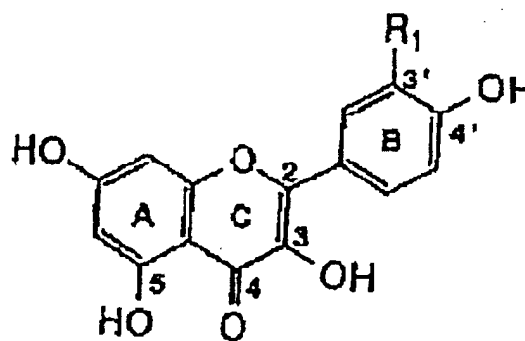


## NEW ANTIOXIDANT

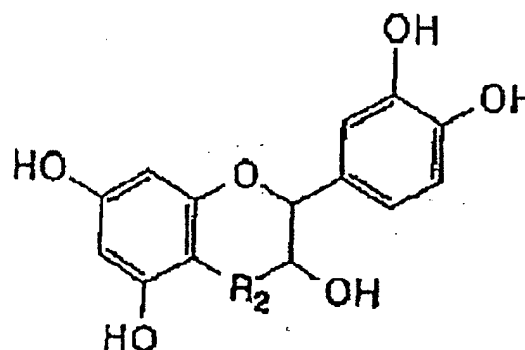
Patent number: JP6248267  
Publication date: 1994-09-06  
Inventor: NAKAYAMA TSUTOMU; KAWAGISHI SHUNRO;  
OSAWA TOSHIHIKO  
Applicant: S I I TECHNO RES YUGEN;; NAKAYAMA TSUTOMU  
Classification:  
- international: C09K15/34; A23L3/3544; C07D311/62  
- european:  
Application number: JP19930076079 19930224  
Priority number(s): JP19930076079 19930224

## Abstract of JP6248267

**PURPOSE:** To obtain a new antioxidant, composed of a specific structure, capable of preventing the toxicity of active oxygen or hydrogen peroxide, excellent in safety and useful as a food, etc. **CONSTITUTION:** The antioxidant is expressed by formula I (R<sub>1</sub> is H or OH) or formula II (R<sub>2</sub> is CH<sub>2</sub> or C=O). Furthermore, the compound expressed by formula I is preferably added in an amount so as to provide 5-20μM concentration to a food. In the case of the compound expressed by formula II, the concentration is preferably 50-1000μM.



I



II

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-248267

(43) 公開日 平成6年(1994)9月6日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 9 K 15/34				
A 2 3 L 3/3544				
// C 0 7 D 311/62		9360-4C		

審査請求 未請求 請求項の数 3 書面 (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平5-76079	(71) 出願人	592184038 有限会社エスアイアイテクノリサーチ 埼玉県比企郡吉見町久保田1501番地
(22) 出願日	平成5年(1993)2月24日	(71) 出願人	593064526 中山 勉 名古屋市千種区千代が丘1-109-409
		(72) 発明者	中山 勉 名古屋市千種区千代が丘1-109-409
		(72) 発明者	川岸 舜朗 愛知県西加茂郡三好町三好八和田70
		(72) 発明者	大沢 俊彦 愛知県春日市押沢台7-9-8

(54) 【発明の名称】 新規抗酸化剤

(57) 【要約】

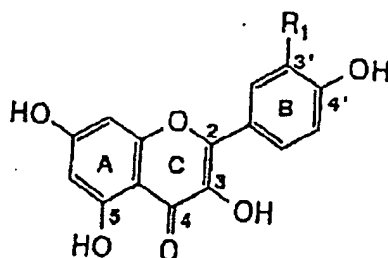
【目的】 活性酸素や過酸化水素に対する細胞毒性の簡便な定量法を用いて、食品添加物として使える安全な抗酸化物を提供する。

【構成】 ケルセチン、ケムフェロール、カテキン、タキシフォリン等の食品中に含まれる安全性の高いフラボノイド類を食品用抗酸化剤として見出した。

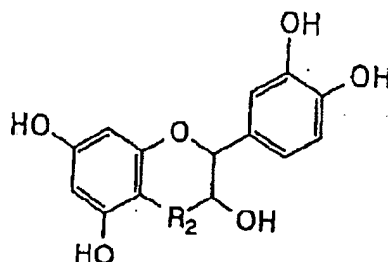
【特許請求の範囲】

\* 【式 (I)】

【請求項1】式 (I) によって示される新規抗酸化剤 \*

式 (I) において  $R_1$  は OH または H を示す。

【請求項2】式 (II) によって示される新規抗酸化剤 ※ ※ 【式 (II)】

式 (II) において  $R_2$  は  $CH_2$  または  $C=O$  を示す。

【請求項3】請求項1または2によって規定される新規抗酸化剤の食品添加物としての用途

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、食品中に含まれ生体に様々な悪影響を与える活性酸素や過酸化水素の毒性を防止し、且つ食品中に含有させることのできる安全な新規抗酸化剤に関する。

【0002】

【従来の技術】コーヒー、紅茶、タバコ等には相当量の活性酸素や過酸化水素が含まれていることが知られている。食品中に含まれる活性酸素や過酸化水素量で発癌性に影響が有るか否かは議論のあるところであり、はっきりと疫学的に発癌性が確証されているのはタバコだけである。しかしながら、活性酸素や過酸化水素が細胞の増殖や、分裂そしてDNAに障害を与えることははっきりしており、活性酸素や過酸化水素による細胞障害を除くことは望まれることである。特に食品中に添加することのできる安全な活性酸素や過酸化水素による細胞障害防止剤（以後抗酸化剤と呼称）は食品産業から強く望まれるところである。ところで、上記物質を探索するためには活性酸素や過酸化水素に対する細胞毒性の簡便な定量法の確立が必要であるが、従来のヨウ素法（中山、月刊フードケミカル1989-12、70-74）、ペルオキシダーゼ等はいずれも活性酸素や過酸化水素自身の定量法であって、活性酸素や過酸化水素に対する細胞毒性

の定量法ではないので不適当である。最近、本発明者等は上記目的にかなった活性酸素や過酸化水素に対する細胞毒性の簡便な定量法を確立し報告した（ツトム ナカヤマ等 フリーラジカルリサーチコミュニケーション (Free Rad. Res. Comms., ) 14 巻、3号、173-178頁、1991）。本抗酸化剤のスクリーニング方法を用いることによって本発明者等はノルジヒドログアレティック酸 (Nordihydroguaretic acid) (ツトム ナカヤマ等、バイオサイエンスバイオテクノロジーバイオケミストリー (Biosci. Biotech. Biochem., ) 56巻 (7)、1162-1163、1992) あるいはゴシポール (gossypol)、エチルプロトカテキエート (ethyl protocatechuate) 等 (ツトム ナカヤマ等、ミューテーションリサーチ (Mutation Research)、281 (1992) 77-80) を見出し報告してきた。本願化合物の上位概念であるフラボノイドについてはボース等 (Bors W, Heller W, Michel C and Saran M, Methods Enzymol 186:343, 355, 1990) が試験管内の化学反応として大変に遅い反応速度での抗酸化作用を報告している。しかし彼等が報告する遅い反応速度では細胞中に取込まれたフラボノイドが細胞外の酸素ラジカルから細胞を防御しているという説明はできない。従って、細胞に取込まれて酸素ラジカルに

よる細胞毒性から細胞を保護する抗酸化物質はこれまで報告されていなかった。つまりボース等のフラボノイドと本発明者等のフラボノイド系物質とは、ほぼ同じ化合物であるが見出された抗酸化剤の作用機構は全く異なっており、本発明者等の作用機序によって実用的な食品用抗酸化剤として使用可能となる。

#### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】上記したようにコーヒー、紅茶等多くの食品中に活性酸素や過酸化水素が含まれておりその毒性が問題となっているため、これら食品中に含まれる活性酸素や過酸化水素による毒作用を防ぐ抗酸化剤の開発が望まれている。従って、本発明者等が開発した活性酸素や過酸化水素に対する細胞毒性の簡便な定量法を用いて数多くの物質をスクリーニングし、食品添加物として使える安全な抗酸化物を見出すことが本発明の課題である。

#### 【0004】

【課題を解決するための手段】上記課題に基づき鋭意研究努力した結果、本発明者等は新たに4種類の抗酸化剤を見出し本研究を完成させた。すなわち、チャイニーズハムスター繊維芽細胞由来V79細胞を各種濃度の被検化合物とともに一定時間(4時間)培養後、培地中の被検化合物を洗浄除去し、その後に細胞を活性酸素や過酸化水素の存在下で培養し、活性酸素や過酸化水素による細胞毒性に対する効果を細胞生存率によって判定し下記式(I)で示される抗酸化剤及び式(II)で示される抗酸化剤を見出した。

式(I)

式(I)においてR<sub>1</sub>はOHまたはHを示す。

式(II)

式(II)においてR<sub>2</sub>はCH<sub>3</sub>またはC=Oを示す。

式(I)で示される抗酸化剤としてはタマネギ等の成分であるケルセチン(Quercetin)及びケムフェロール(Kaempferol)があげられ、式(II)で示される抗酸化剤としてはお茶等の成分であるカテキン(Catechin)、タキシフォリン(Taxifolin)が上げられる。本抗酸化剤は単独で食品添加物として使用することもまた単独あるいは賦形剤あるいは他補助剤とともに薬剤として投薬することもできる。薬剤として投与する場合の剤形としては、錠剤、カプセル、アンプル、細粒、顆粒、注射、坐剤、等にして使用できる。投与経路としては内服、静注、筋注、点滴、皮下注、坐薬として投与できる。本抗酸化剤の最適\*

\*使用量は食品添加物としての場合には一般式(I)で示される抗酸化剤では1~100μMの濃度が、好ましくは5~20μMの濃度になるように添加するのが良い。また一般式(II)で示される抗酸化剤では10~5000μMの濃度が、好ましくは50~1000μMの濃度になるように添加するのが良い。さらに薬剤として投与する場合には血中濃度が上記になるように投与するのが良い。

#### 【0005】

10 【作用】上述したように本化合物は食品添加物として充分実用に耐える程に低い濃度で抗酸化作用を発揮する。従って、本抗酸化剤を使用することにより食品中に存在または発生する活性酸素や過酸化水素による毒性から生体を守ることができる。また薬剤として投薬したばあいにはスカベンジング(消去)作用の失調によって生じる様々な疾患、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、リュウマチ、糖尿病等の予防ならびに治療薬として使用することができる。

#### 【0006】

20 【実施例】以下に実施例を上げて本発明を詳細に説明するがこれによって本発明が制限されるわけではない。

#### 【0007】細胞毒性の測定方法

基本的には、ツトム ナカヤマ等

フリーラジカルリサーチコミュニケーション(Free Rad. Res. Comms.,)14巻、3号、173-178頁、1991の方法に従って検索した。すなわち、チャイニーズハムスター繊維芽細胞由来V79細胞を37℃で空気中、5%炭酸ガスを含む湿潤下で、直径60ミリのペトリ皿に播種し(200細胞/皿)熱不活化仔牛血清(FBS)の10%を含む5mlのMEM培地中でインキュベートした。FBSを含まないMEM培地に交換後、各種濃度になるように被検化合物を添加し4時間インキュベートする。HEPES緩衝食塩水(pH7.3)で細胞を洗浄後、HEPES緩衝食塩水(pH7.3)中の細胞を酸素ラジカル種(60μMあるいは50μMのヒポキサンチン+0.025単位のキシランチン酸化酵素の混液)で30分間処理した。10%FBSを付加したMEM培地で5日間培養後、本発明者等の文献に述べた方法(ツトム ナカヤマ等フリーラジカルリサーチコミュニケーション(Free Rad. Res. Comms.,)14巻、3号、173-178頁、1991)に従って計算した。

### 【酸素ラジカル種で処理した各種被検化合物】の細胞数

細胞生存率(%) = -----

### 酸素ラジカル種で無処理の細胞数

結果は別々に処理され実験された値の平均値±SDで示し、t検定を行なった。

#### 実施例1

50 ケルセチン(Quercetin)及びケムフェロール

(Kaempferol)、カテキン (catechin)、タキシフォリン (Taxifolin) などのフラボノイドを培地に加え一定時間インキュベートした。細胞を洗浄後、過酸化水素で処理することによって過酸化水素による細胞毒性に対する前記フラボノイドの抗酸化作用を検討した。図1に示したようにケルセチン及びケムフェロールは5  $\mu$ M以上で細胞の生存率を有意に上昇した。さらにカテキンは500  $\mu$ M以上で、またタキシフォリンは60  $\mu$ M以上で有意に細胞生存率を上昇し抗酸化作用を示した。

#### 【0008】実施例2

ケルセチン (Quercetin) 及びケムフェロール (Kaempferol)、カテキン (catechin)、タキシフォリン (Taxifolin) などのフラボノイドを培地に加え一定時間インキュベートした。細胞を洗浄後、ヒポキサンチンとキサンチンオキシダーゼで処理することによって活性酸素による細胞毒性に対する前記フラボノイドの抗酸化作用を検討した。図2に示したようにケルセチンは5  $\mu$ M以上で、ケムフェロールは10  $\mu$ M以上で細胞の生存率を有意に上昇した。さらにカテキンは500  $\mu$ M以上で、またタキシフォリンは60  $\mu$ M以上で有意に細胞生存率を上昇し抗酸化作用を示した。

#### 【0009】実施例3

ケルセチン (Quercetin) 及びケムフェロール (Kaempferol)、カテキン (Catechi

n)、タキシフォリン (Taxifolin) などのフラボノイドを培地に加え一定時間インキュベートした。MEM (+FBS) 中で5日間培養し、細胞生存率より前記フラボノイド自体の細胞毒性を検討した。図3に示したようにケルセチン及びケムフェロールは100  $\mu$ M以上で有意の細胞毒性を示した。またカテキン、タキシフォリンは1000  $\mu$ Mでも何等細胞毒性を示さなかった。

【発明の効果】本発明の化合物はいずれも食品に含まれる化合物であり、しかもその有効濃度は実用的な程度に十分に低いので、食品添加物として添加することによって、食品に含まれる活性酸素や過酸化水素による毒作用を防ぐことができる安全な抗酸化剤として用いることができる。また薬剤として使用したばあいにはスカベンジング (消去) 作用の失調によって生じる様々な疾患、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、リュウマチ、糖尿病等の予防ならびに治療薬として使用することもできる。

#### 【図面の簡単な説明】

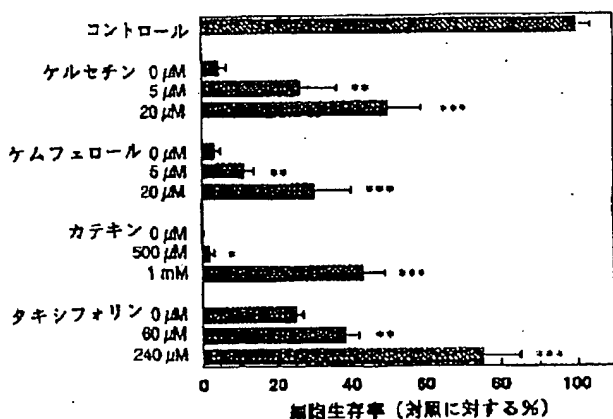
【図1】各種化合物の過酸化水素による細胞毒性に対する抗酸化作用。

【図2】各種化合物の活性酸素による細胞毒性に対する抗酸化作用。

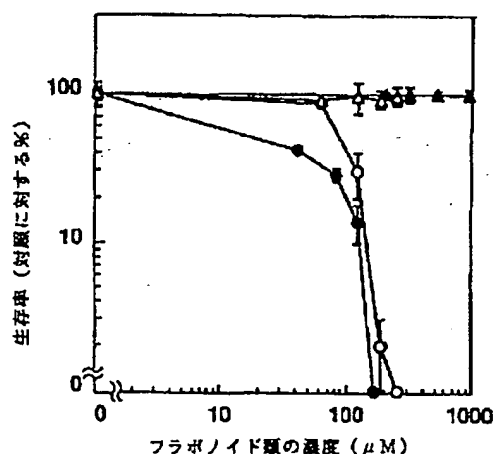
#### 【図3】抗酸化剤自体の細胞毒性

●: ケルセチン、○: ケムフェロール、□: カテキン、▲黒四角▼: タキシフォリン。

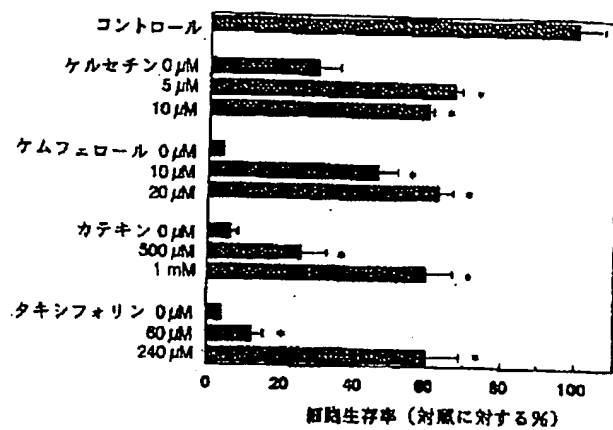
【図1】



【図3】



【図2】



## 報 文

## Penicillium 属糸状菌由来培養液によるルチン分解反応

成川隆也, 辛木裕子\*, 篠山浩文, 藤井貴明\*  
(千葉大学大学院自然科学研究科, \*千葉大学園芸学部)

平成9年7月24日受理

## Rutin Degradation by Culture Filtrates from Penicillia

Tatsuya NARIKAWA, Yuko KARAKI,\* Hirofumi SHINOYAMA, and Takaaki FUJII\*

Graduate School of Science and Technology, Chiba University,  
1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba-shi, Chiba 263-0022

\*Department of Bioproduction Science, Faculty of Horticulture,  
Chiba University, 648 Matsudo, Matsudo-shi, Chiba 271-8510

The degradation of rutin by culture filtrates from penicillia was investigated. Fifteen of 32 species of penicillia utilized rutin, and the rutin degradation by their culture filtrates was examined. By qualitative analysis of the reaction products with thin-layer chromatography, culture filtrates from *P. herquei*, *P. rugulosum*, *P. funiculosum*, and *P. brevicompactum* degraded rutin to rutinose and the culture filtrate from *P. purpurogenum* degraded it to glucose, rhamnose, and isoquercitrin. Culture filtrates from these five penicillia were mixed with several glycosides or cellobiose. *P. funiculosum* degraded naringin and hesperidin. *P. herquei* and *P. purpurogenum* degraded methyl  $\beta$ -glucoside, *p*-nitrophenyl  $\beta$ -glucoside, and cellobiose. *P. purpurogenum* degraded naringin and *p*-nitrophenyl  $\alpha$ -rhamnoside, also. Methyl  $\beta$ -rutinoside was produced in a reaction mixture containing 25% (v/v) methanol and culture filtrates from *P. herquei*, *P. funiculosum*, or *P. brevicompactum*.

(Received July 24, 1997)

Key words: rutin; penicillia;  $\beta$ -rutinosidase; transrutinosylation.

## 緒 言

ルチンは、エンジュ、タバコ、ソバをはじめとする多くの植物に含まれているフラボノール配糖体であり、アグリコンであるケルセチンに、グルコースとラムノースからなるヘテロ二糖のルチノースが結合した構造を有している (Fig. 1)。その生理活性としては、毛細血管強化<sup>(1)</sup>、高血圧予防<sup>(2)</sup>、酸化防止<sup>(3,4)</sup>などが知られており、また、植物にとっては、紫外線防止剤、抗酸化成分<sup>(5,6)</sup>、植物アレキシン<sup>(7)</sup>、防虫物質<sup>(8)</sup>などとして働いている可能性が示唆されている。さらに、昆虫においては、ナミアゲハの産卵刺激物質<sup>(9)</sup>、カイコの摂食行動忌避物質としての作用<sup>(10)</sup>が認められている。一方、ルチンの代謝<sup>(11)</sup>や腸内細菌<sup>(12-15)</sup>、その他の微生物<sup>(16-21)</sup>による分解についても研究されてお

り、微生物由来のルチン分解酵素としてはアグリコンであるケルセチンを分解するケルセチナーゼ<sup>(17)</sup>および糖質加水分解酵素である $\alpha$ -ラムノシダーゼ<sup>(14, 16, 19)</sup>、 $\beta$ -グルコシダーゼ<sup>(13-15, 18, 19)</sup>、ルチナーゼ<sup>(17)</sup>の存在が見いだされている。前者のケルセチナーゼは Simpson らにより精製され反応機構なども明らかにされている<sup>(22-24)</sup>が、後者の糖質加水分解酵素群においては、*Aspergillus flavus* 由来のルチナーゼが部分精製され、その基質特異性や pH および温度依存性などの性質について調べられている<sup>(25)</sup>。他は、その存在が報告されているだけで、ほとんど精製されておらず、酵素学的性質の知見も概して得られていない。ルチナーゼと同様な活性を有する酵素は、植物においても、その存在が数例<sup>(26-29)</sup>報告されているが、電気泳動的に単一にまで精製されたものはダットンそば<sup>(29)</sup>に見られるだ

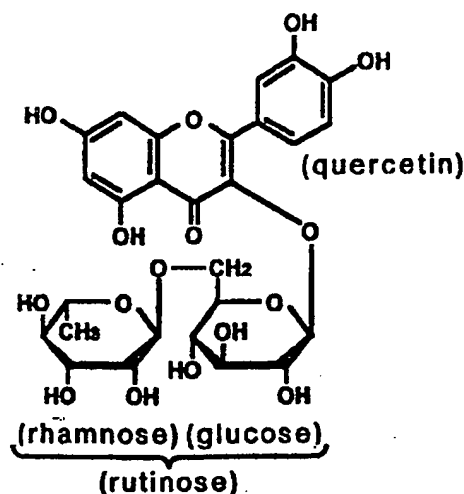


Fig. 1. The Structure of Rutin.

けで、これも *A. flavus* 由来ルチナーゼと同様。酵素の反応機構や構造についてはほとんど不明である。また、これらルチンの分解に関与する糖質加水分解酵素の種類や性質が、微生物によって異なっていることは、各々の微生物がどのようにルチンを認識し質化しているのかを解明する上で、重要な手がかりの一つと考えられる。しかしながら、なぜこのような違いが生じるのかについては、現在までのところ、よくわかっていない。さらに、ルチン分解微生物としては特に *Aspergillus* 属糸状菌について多く研究されている(17, 18, 20, 22~25)ものの、同様に代表的な菌類である *Penicillium* 属においてはほとんどなされていない。

そこで著者らは、上記の問題を解明する一環として、まず、供試菌として *Penicillium* 属糸状菌を用い、ルチン質化能を検索し、質化した菌の培養液によるルチンおよび各種配糖体、セロビオースの分解性、ルチン分解活性、糖転移活性について検討したので報告する。

#### 実験材料および方法

##### 1. 使用菌種

(財)発酵研究所(以下、IFOと略記)より分譲頂いた、下記の *Penicillium* 属 30 種および *Eupenicillium* 属 2 種をポテト・デキストロース寒天(PDA)斜面培地にて生育させ、使用した。菌種名の後の数字は IFO 番号を表す。

*P. adametzii* 8050, *P. albicans* 6771,  
*P. brevicompactum* 5884, *P. canescens* 7962,  
*P. citrinum* 7784, *P. commune* 7224,  
*P. cyclopium* 7226, *P. decumbens* 31297,  
*P. digitatum* 9651, *P. duclauxii* 5690,  
*P. expansum* 8800, *P. frequentans* 7921,  
*P. funiculosum* 31968, *P. gladioli* 5766,  
*P. herquei* 31747, *P. implicatum* 6583,  
*P. italicum* 9419, *P. janthinellum* 31969,  
*P. lilacinum* 31970, *P. nigricans* 31971,  
*P. ochraceum* 7748, *P. oxalicum* 7000,  
*P. pallidum* 5758, *P. purpurogenum* 6022,  
*P. raistrickii* 6104, *P. restrictum* 7922,  
*P. rugulosum* 7242, *P. terrestre* 5765,  
*P. urticae* 8171, *P. viridicatum* 30181,  
*E. javanicum* 7992, *E. shearii* 31889

##### 2. 培養方法および使用培養液

100 ml 容三角フラスコに液体培地 30 ml [2% ルチン, 0.3%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.4%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.04%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.02% 酵母エキス, 0.25% (v/v) 微量ミネラル溶液。なお、微量ミネラル溶液の組成は 0.05%  $\text{NaCl}$ , 0.6%  $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ , 0.2%  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1%  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.01%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.01%  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.01%  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.02%  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.4%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  である。] を調製し、これに上記 1 の各菌種をそれぞれ白金耳接種。30℃, 8 日間回転振とう培養(180 rpm)した。このうち、比較的生育の良好な 15 菌種を東洋濾紙 No. 2 を用いてろ過し、得られたろ液に終濃度 0.02% となるよう  $\text{NaN}_3$  を加え、これを使用培養液として実験に供した。

##### 3. ルチン質化性菌由来培養液によるルチンおよび各種配糖体、セロビオースの分解反応

培養液 1.5 ml, ルチンまたは各種配糖体、セロビオース 20 mg, 水 0.5 ml を混合し、30℃, 24 時間反応させた後、反応生成物を薄層クロマトグラフィー(TLC)により分析した。また、培養液中に微量のルチノースが存在していた *P. brevicompactum*, *P. decumbens*, *P. funiculosum*, および *P. oxalicum* に関しては、その培養液を 20 mm 酢酸緩衝液, pH 5.0, に対して透析しルチノースを除去後、使用した。



s 7962,

297,

21,

66,

3,

369,

71,

1,

1022,

2,

ml [2% ルチン  
14% MgSO<sub>4</sub>・  
微量ミネラル  
0.05% NaCl  
7 H<sub>2</sub>O, 0.1%  
0.01% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>  
0.02% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
これに上記 1  
: 8 日間回転  
比較的生育の  
てろ過し、得  
NaNO<sub>3</sub> を加え、

ルチンおよび  
反応  
、セロビオ  
24 時間反応  
グラフィー  
に著量のルチ  
、*P. decum-*  
*-m* に関して  
5.0, に対し

#### 4. 薄層クロマトグラフィー (TLC) による反応生成物の検出

薄層としてワットマンシリカゲルプレート LK6D を、展開溶媒としてアセトニトリル/水 (5:1, v/v) を使用し、試料を分離した。その後、発色剤として 50% (v/v) 硫酸溶液を噴霧、120℃, 10 分間加熱し発色させ、反応生成物を検出した。

#### 5. β-グルコシダーゼおよびα-ラムノシダーゼ活性の測定

β-グルコシダーゼ活性<sup>(28,31)</sup> は、50 mM フェニルβ-グルコシド (20 mM 酢酸緩衝液, pH 5.0) を基質液として使用した。すなわち、基質液 0.5 ml、任意に希釈した培養液 0.5 ml を 30℃, 15 分間反応させた後、0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 5 ml を加え反応を停止させた。生成したフェノール量をフォーリン・チオカルトール試薬 1 ml にて発色させ、660 nm において比色定量した。この反応系で、1 分間に遊離するフェノールの μmol 数をもってβ-グルコシダーゼ活性の単位とした。

また、α-ラムノシダーゼ活性<sup>(28,30)</sup> は、3 mM p-ニトロフェニルα-ラムノシド (20 mM 酢酸緩衝液, pH 5.0) を基質液として使用した。すなわち、基質液 3 ml、同緩衝液 0.5 ml、任意に希釈した培養液 0.5 ml を、30℃, 15 分間反応させた後、0.4 M グリシン・NaOH 緩衝液, pH 10.4, 2.5 ml を加え反応を停止させた。その後、反応液を 5500×g にて 10 分間遠心分離し、その上清を 400 nm において比色定量した。この反応系で、1 分間に遊離する p-ニトロフェノールの μmol 数をもってα-ラムノシダーゼ活性の単位とした。

#### 6. ルチン分解活性の測定

50 ml メスフラスコ内のルチン 10 mg を 20 mM 酢酸緩衝液, pH 5.0, 0.5 ml に懸濁させ、これに、あらかじめ同緩衝液にて透析した培養液 3.0 ml を加え、30℃ にて、振とう反応後、メタノール 30 ml を加えることにより酵素反応を停止させた。その後、内部標準物質としてアルブチンを 0.04% (終濃度) となるよう加え 50 ml に定容し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて、ルチンの減少量を測定した。この反応系で、1 分間に分解するルチンの μmol 数をもってルチン分解活性の単位とした。

#### 7. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるルチンの定量

(株)島津製作所製の LC-9A 型 HPLC 分析計を使用し、次の操作条件にて測定した。カラム, TSK-GEL Amido-80 (4.6 mm×25 cm, Tosoh); 溶媒, 酢酸エチル/酢酸/水 (6:1:1, v/v/v); 流速, 0.8 ml/min; 検出波長, 300 nm; カラム温度, 室温。

#### 8. ルチン還元性菌由来培養液によるルチンおよびメタノール共存下の反応

培養液 1.5 ml, ルチン 20 mg, メタノール 0.5 ml を混合し、30℃, 24 時間反応させた。その後、反応液を 11,000×g にて 20 分間遠心分離し、その上清を 4 に示した TLC により分析した。

#### 9. 試薬類

ルチン, ヘスペリジンは和光純薬工業(株)製を、ナリンジンは Aldrich 社製を、イソケルシトリンはフナコシ(株)製を、p-ニトロフェニルβ-グルコシド, p-ニ

Table 1. Released Sugars in the Rutin-degrading Reaction by Culture Filtrates from Rutin-utilizing *Penicillia*

The degrading reaction was carried out with 2% (w/v) rutin as the substrate at 30℃ for 24 h. Each reaction mixture was analyzed by TLC on a Whatman LK 6 D silica gel plate, using the solvent system of acetonitrile-H<sub>2</sub>O (5:1). The sugars were qualitatively detected by spraying with 50% (v/v) sulfuric acid solution.

Rutin-utilizing penicillia	Released sugars*
<i>P. adametzii</i> IFO 8050	None
<i>P. brevicompactum</i> IFO 5884	Ru
<i>P. canescens</i> IFO 7962	None
<i>P. citrinum</i> IFO 7784	None
<i>P. decumbens</i> IFO 31297	None
<i>P. frequentans</i> IFO 7921	None
<i>P. funiculosum</i> IFO 31968	Ru
<i>P. herquei</i> IFO 31747	Ru
<i>P. nigricans</i> IFO 31971	None
<i>P. ochraceum</i> IFO 7748	None
<i>P. oxalicum</i> IFO 7000	None
<i>P. purpurogenum</i> IFO 6022	G, R, I
<i>P. raistrickii</i> IFO 6104	None
<i>P. rugulosum</i> IFO 7242	Ru
<i>P. javanicum</i> IFO 7992	None

\* G, glucose; I, isoquercitrin; R, rhamnose; Ru, rutinose.

トロフェニル $\alpha$ -ラムノシド, メチル $\beta$ -グルコシドは Sigma 社製を, フェニル $\beta$ -グルコシドはナカライテスク(株)製を, メチル $\beta$ -ルチノシドは既報<sup>12)</sup>で得られたものを使用した. その他の試薬はすべて市販の特級品を使用した.

### 実験結果

#### 1. ルチン液体培地における生育と培養液のルチン分解性

ルチン液体培地における *Penicillium* 属および *Eupenicillium* 属糸状菌の生育と得られた培養液のルチン分解性を検討した (Table I). 供試菌 32 種中, 15 種がルチン液体培地にて比較的生育が良好であった. これら 15 種の培養液にルチンを加え反応させ, ルチンの分解性について遊離される糖質を TLC にて検出

することにより検討したところ, ルチンを分解しないもの, ルチンを分解し主にルチノースを遊離するもの, ルチンを分解してグルコース, ラムノース, イソケルシトリンを遊離するものが認められた.

2. 培養液の各種配糖体およびセロビオース分解性  
上記 1 においてルチン分解性を示した 5 菌種の培養液の各種配糖体およびセロビオースに対する分解性を TLC を用いて検討した (Table II). *P. funiculosum* の培養液はヘスベリジンおよびナリンジンを分解した. *P. herquei* は *p*-ニトロフェニル $\beta$ -グルコシド, メチル $\beta$ -グルコシド, およびセロビオースを分解し, *P. purpurogenum* の場合は, ヘスベリジン以外の基質をすべて分解した. しかし, *P. brevicompactum* と *P. rugulosum* の培養液ではルチン以外の供試基質の分解が認められなかった.

Table II. Hydrolysis of Several Glycosides and Cellobiose by Culture Filtrates from Rutin-utilizing *Penicillia*  
The hydrolytic reaction of several glycosides and cellobiose and the analysis of the products were carried out as described in Table I.

Penicillia tested	Released sugars from <sup>a</sup>						
	Rn	H	N	NR	NG	MG	C
<i>P. brevicompactum</i>	Ru	—	—	—	—	—	—
<i>P. funiculosum</i>	Ru	Ru	G, R <sup>b</sup>	—	G	G	G
<i>P. herquei</i>	Ru	—	—	—	—	—	—
<i>P. rugulosum</i>	Ru	—	—	—	G	G	G
<i>P. purpurogenum</i>	G, R, I	—	G, R <sup>b</sup>	R	G	G	G

<sup>a</sup> Rn, rutin; H, hesperidin; N, naringin. NR, *p*-nitrophenyl  $\alpha$ -rhamnoside; NG, *p*-nitrophenyl  $\beta$ -glucoside; MG, methyl  $\beta$ -glucoside; C, cellobiose; G, glucose; I, isoquercitrin; R, rhamnose; Ru, rutinose; —, not detected.  
<sup>b</sup> A substance was detected together that was considered as prunin (naringenin 7-glucoside).

Table III.  $\beta$ -Glucosidase,  $\alpha$ -Rhamnosidase, and Rutin-degrading Activities in Culture Filtrates from Rutin-utilizing *Penicillia*

$\beta$ -Glucosidase and  $\alpha$ -rhamnosidase activities were measured with phenyl  $\beta$ -glucoside and *p*-nitrophenyl  $\alpha$ -rhamnoside, respectively, as substrates. Rutin-degrading activity was determined by measuring the decrease of rutin by HPLC. Each one unit (U) in these assays was defined as the amount of enzyme activity which degraded 1  $\mu$ mol of the substrate per min at 30°C and pH 5.0. The other reaction conditions were described in the text.

Penicillia tested	$\beta$ -Glucosidase (U/ml)	$\alpha$ -Rhamnosidase (U/ml)	Rutin-degrading (U/ml)
<i>P. brevicompactum</i>	N. D. <sup>a</sup>	N. D.	0.004
<i>P. funiculosum</i>	N. D.	N. D.	0.01
<i>P. herquei</i>	0.02	N. D.	0.005
<i>P. rugulosum</i>	N. D.	N. D.	0.01
<i>P. purpurogenum</i>	0.02	0.4	0.04

<sup>a</sup> N. D., not detectable.

分解しない  
遊離するも  
ース, イソ

ース分解性  
5菌種の培  
する分解性  
niculosum  
ノを分解し  
コシド, メ  
分解し, P.  
4の基質を  
lum と P.  
基質の分

micillia  
ried out

C

G

G

G, methyl

Rutin-

phenyl  
decrease  
which  
ibed in

ing

### 3. 培養液の $\beta$ -グルコシダーゼ, $\alpha$ -ラムノシダーゼ, およびルチン分解活性

上記2で検討した5菌種の培養液中の $\beta$ -グルコシダーゼ,  $\alpha$ -ラムノシダーゼ, およびルチン分解活性を測定した (Table III).

$\beta$ -グルコシダーゼ活性が認められたものは *P. herquei* と *P. purpurogenum* の二つの培養液のみであり,  $\alpha$ -ラムノシダーゼ活性については *P. purpurogenum* のみに認められ, 上記2の TLC による結果と一致した. また, ルチンの減少率を測定することによるルチン

ン分解活性はすべてに認められ, *P. purpurogenum* が最も高い活性を示した.

### 4. 培養液のルチンおよびメタノール共存下における反応

安田ら<sup>(20)</sup>は, ダックンそば由来ルチン分解酵素の活性を測定する際, 難水溶性のルチンを可溶化するためにメタノールを添加したところ, ルチン分解酵素の糖転移反応によりメチル $\beta$ -ルチノシドが生成したことを報告している. そこで, *Penicillium* 属糸状菌由来のルチン分解酵素系においても, ルチンおよびメタノール共存下の反応について検討した. すなわち, 2, 3で検討した *Penicillium* 属5種の培養液にルチンと終濃度が25% (v/v) となるようにメタノールを加え反応を行い, その上清を TLC にて分析することにより反応生成物を調べた (Fig. 2).

*P. brevicompactum*, *P. funiculosum*, *P. herquei* に関してはメチル $\beta$ -ルチノシドの生成が認められたが, *P. rugulosum* ではその生成は認められなかった. 一方, *P. purpurogenum* の場合はメチル $\beta$ -グルコシドおよびメチル $\alpha$ -ラムノシドの生成が示唆された.

### 考 察

ルチンの分解に関与する酵素としては, 緒言でも述べたように,  $\alpha$ -ラムノシダーゼなどの数種の糖加水分解酵素が報告されている<sup>(12-19)</sup>. 本報告においても, *P. brevicompactum*, *P. funiculosum*, *P. herquei*, および *P. rugulosum* 由来の培養液に, ルチンを加え反応させたところ, ルチンを分解してルチノースを遊離する反応が認められ, Fig. 3(A) に示した反応を触媒する " $\beta$ -ルチノシダーゼ"<sup>(10)</sup> が産生されているものと考えられる. しかしながら, *P. herquei* の場合, その培養液に $\beta$ -グルコシダーゼ活性が認められたため, その基質特異性の範囲でルチンを分解してルチノースを遊離している可能性も考えられる<sup>(12, 14)</sup>. また, *P. purpurogenum* は,  $\alpha$ -ラムノシダーゼと $\beta$ -グルコシダーゼによりルチンを分解していることが示唆され (Fig. 3(B)), これらの酵素によるルチンの分解様式は, 岡田らがフラボノイド配糖体加水分解酵素に関する一連の研究<sup>(12, 23)</sup>において見いだしたナリンジナーゼ, ヘスペリジナーゼ, フラボノイドグルコシダーゼIによる配糖体分解様式に類似していると考えられる.

また, ルチン分解活性を有している5菌種の培養液

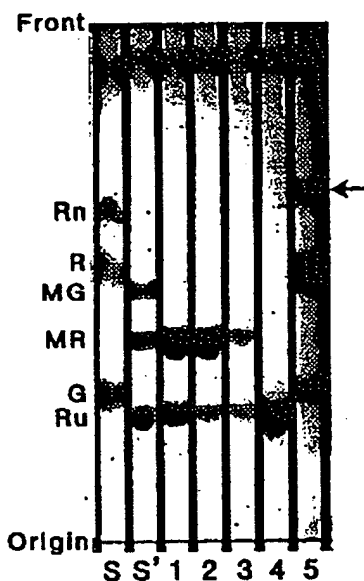


Fig. 2. Thin Layer Chromatogram of the Reaction Products from Rutin in the Presence of Methanol by Culture Filtrates from Rutin-utilizing *Penicillia*.

The reaction was carried out with 2% (w/v) rutin and in the presence of 25% (v/v) methanol at 30°C for 24 h. The reaction mixtures were centrifuged at 11,000 $\times g$  for 20 min and the supernatants were analyzed by the method as described in Table I. Thin layer was scanned with GT-6500 ART 2 (EPSON). An arrow shows the spot that is considered as methyl  $\alpha$ -rhamnoside.

S and S', standards (Rn, rutin; R, rhamnose; MG, methyl  $\beta$ -glucoside; MR, methyl  $\beta$ -rutinoside; G, glucose; Ru, rutinose); 1, *P. brevicompactum*; 2, *P. funiculosum*; 3, *P. herquei*; 4, *P. rugulosum*; 5, *P. purpurogenum*.

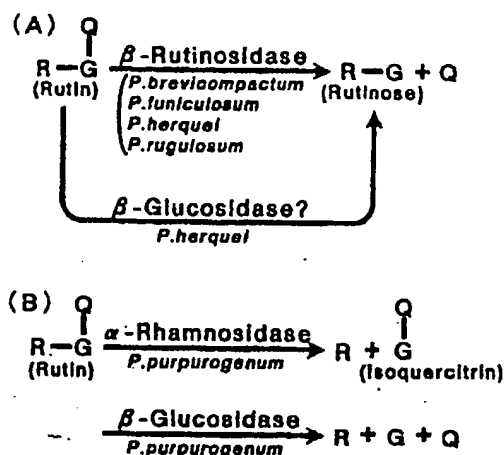


Fig. 3. Possible Extracellular Glycosidases Produced by Rutin-utilizing *Penicillia* for Its Degradation.

G, glucose; R, rhamnose; Q, quercetin.

には, *P. funiculosum* のようにルチン以外の配糖体を分解するものが存在する。各培養液中の酵素を精製していないのではっきりとしたことは言えないが, *P. funiculosum* のルチノースを遊離させることによるヘスペリジン分解性は $\beta$ -ルチノシダーゼの作用による可能性も考えられる。さらに, *P. funiculosum* の培養液は, ナリンジンを分解してラムノースを遊離するが, *p*-ニトロフェニル $\alpha$ -ラムノシドを作用させたときには, その分解性を示さずラムノースを遊離しない。このような *P. funiculosum* 培養液による配糖体に対する分解様式の差は, ラムノースの結合位置の認識に差がある複数の酵素の存在を示唆するものであるが, 基質特異性の広い同一酵素による可能性も考えられ, 今後, 以上のことを明らかにするためにも, 培養液から $\beta$ -ルチノシダーゼを精製する必要がある。

一方, *Aspergillus niger* 由来 $\beta$ -キシロシダーゼなど<sup>21,24</sup> のように糖質加水分解酵素の一部には, アルコール類やフェノール類の存在下で糖転移作用を示すものが知られており, 本報告でも, *P. brevicompactum*, *P. funiculosum*, および *P. herquei* の培養液において,  $\beta$ -ルチノシダーゼあるいは $\beta$ -グルコシダーゼの糖転移作用によるものと考えられるメチル $\beta$ -ルチノシドの生成が認められた。しかしながら, *P. rugulosum* 由来 $\beta$ -ルチノシダーゼのように, ルチノースは遊離するものの, 糖転移能は有さないものも存在した。

これまで, ルチン分解酵素系におけるルチノース転移反応に関しては, 安田らのダットンそば由来ルチン分解酵素における報告以外にはなく, 本研究は微生物由来ルチン分解酵素系において, 初めてルチノース転移反応を見いだした例と思われる。

以上のように, ルチンを分解する糖質加水分解酵素が, 各微生物において, その種類や性質の点で異なっていることを明らかにすることは, 緒言で述べた意義のほかに, ルチンなどの配糖体の自然界における存在意義, 機能と微生物との関係を解明する上からも重要であると思われる。しかしながら, こうした問題に着眼した研究は現在までのところほとんど見当たらず, また, 本研究のように同属内の微生物におけるルチン分解酵素について詳細に研究した例もない。今後, 本報告で示したように, ルチンという一つの配糖体に対して多様性に富む対応をしている *Penicillium* 属糸状菌について, そのルチン分解酵素群を分離, 精製し, 性質を明らかにすることによって, 上述した問題に取り組んでいきたいと考えている。

## 要 約

(1) ルチン資化性 *Penicillium* 属糸状菌を検索するため, 供試菌 32 種をルチンを炭素源とする液体培地にて培養したところ, 15 種が比較的良好な生育を示した。これら 15 種の培養液のルチン分解性を TLC を用いて調べたところ, ルチンを分解しないもの, ルチンを分解しおもにルチノースを遊離するもの (*P. brevicompactum*, *P. funiculosum*, *P. herquei*, *P. rugulosum* の 4 種), ルチンを分解しグルコース, ラムノース, イソケルシトリンを遊離するもの (*P. purpurogenum*) が認められた。

(2) (1) でルチン分解性を示した 5 菌種の培養液について, ルチン以外の各種配糖体およびセロビオースの分解性を調べたところ, *P. funiculosum* の培養液はヘスペリジンとナリンジンを分解した。 *P. herquei* と *P. purpurogenum* は *p*-ニトロフェニル $\beta$ -グルコシド, メチル $\beta$ -グルコシド, およびセロビオースを分解し, また, *P. purpurogenum* は, *p*-ニトロフェニル $\alpha$ -ラムノシドやナリンジンも分解した。

(3) ルチン分解性を示した 5 菌種の培養液にルチンとメタノール (終濃度 25%) を加え反応させ, 反応生成物を調べたところ, *P. brevicompactum*, *P. fu-*

ルチノース転移  
は由来ルチン分  
解は微生物由  
ルチノース転移

質加水分解酵素  
質の点で異なっ  
て述べた意義  
界における存在  
る上からも重要  
うした問題に着  
と見当たらず、  
におけるルチン  
ない。今後、本  
つの配糖体に対  
*Penicillium* 属糸状  
菌を精製し、  
述した問題に取

状菌を検索する  
とする液体培地  
良好な生育を示  
ン分解性を TLC  
しないもの、ル  
運するもの (*P.*  
*herquei*, *P. rugu-*  
*cosum*, ラムノ  
の (*P. purpuro-*

菌種の培養液に  
びセロビオース  
*sum* の培養液は  
、*P. herquei* と  
ルβ-グルコシド、  
ースを分解し、  
フェニルα-ラム

の培養液にルチ  
を反応させ、反応  
=pectum, *P. fu-*

*niculosum*, *P. herquei* の培養液においてメチルβ-ルチ  
ノシドの生成が認められた。

- (1) S. Ruzsnyak and A. Szent-Gyorgyi: *Nature*, 138, 27 (1936).
- (2) Y. Matubara, H. Kumamoto, Y. Iizuka, T. Murakami, K. Okamoto, H. Miyake, and K. Yokoi: *Agric. Biol. Chem.*, 49, 909-914 (1985).
- (3) I. B. Afanas'ev, A. I. Dorozhko, A. V. Brodskii, V. A. Kostyuk, and A. I. Potapovitch: *Biochem. Pharmacol.*, 38, 1763-1769 (1989).
- (4) J. Torel, J. Cillard, and P. Cillard: *Phytochemistry*, 25, 383-385 (1986).
- (5) A. E.-G. Amira and R. M. A. Mansour: *Zentralbl. Mikrobiol.*, 141, 561-565 (1986).
- (6) B. E. Tabashnik: *J. Chem. Ecol.*, 13, 309-316 (1987); B. E. Tabashnik: *Environ. Entomol.*, 14, 575-578 (1985).
- (7) T. Ohsugi, R. Nishida, and H. Fukami: *Appl. Ent. Zool.*, 28, 29-40 (1991).
- (8) 高橋英一, 深海 浩昭: 「ハルボーン 化学生態学」, 文永堂, 東京, 1981, pp. 141-144.
- (9) L. A. Griffiths and A. Barrow: *Biochem. J.*, 130, 1161-1162 (1972).
- (10) S. Baba, T. Furuta, M. Horie, and H. Nakagawa: *J. Pharm. Sci.*, 70, 780-782 (1981); S. Baba, T. Furuta, M. Fujioka, and T. Goromaru: *J. Pharm. Sci.*, 72, 1155-1158 (1983).
- (11) O. Takacs, S. Benko, L. Varga, A. Antal, and M. Gabor: *Angiologica*, 9, 175-180 (1972).
- (12) C. P. Sharma, G. P. Kaushal, V. K. Sareen, and S. Singh: *Indian J. Biochem. Biophys.*, 18, 85 (1981).
- (13) I. A. Macdonald, R. G. Bussard, D. M. Hutchison, and L. V. Holdeman: *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 350-355 (1984).
- (14) V. D. Bokkenheuser, C. H. L. Shackleton, and J. Winter: *Biochem. J.*, 248, 953-956 (1987).
- (15) A. K. Mallett, C. A. Bearn, B. G. Lake, and I. R. Rowland: *Food Chem. Toxic.*, 27, 607-611 (1989).
- (16) S. Hattori and I. Noguchi: *Bot. Mag. (Tokyo)*, 71, 43-47 (1958); S. Hattori and I. Noguchi: *Nature*, 184, 1145-1146 (1959).
- (17) D. W. S. Westlake, G. Talbot, E. R. Blakley, and F. J. Simpson: *Can. J. Microbiol.*, 5, 621-629 (1959).
- (18) 岡田茂孝: 科学と工業, 37, 259-263 (1963).
- (19) 谷 美樹, 大森俊雄, 児玉 徹, 養田泰治: 昭和 61 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1986, p. 246; 今野玲子, 大森俊雄, 児玉 徹: 昭和 62 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1987, p. 633.
- (20) J. Padron, K. L. Grist, J. B. Clark, and S. H. Wender: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 3, 412-416 (1960).
- (21) A. Brantner and H. Brantner: *Planta Med.*, 58 (Suppl. Issue 1), A668-A669 (1992).
- (22) H. G. Krishnamurthy and F. J. Simpson: *J. Biol. Chem.*, 245, 1467-1471 (1970).
- (23) T. Oka, F. J. Simpson, J. J. Child, and S. C. Mills: *Can. J. Microbiol.*, 17, 111-118 (1971).
- (24) T. Oka and F. J. Simpson: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43, 1-5 (1971).
- (25) G. W. Hay, D. W. S. Westlake, and F. J. Simpson: *Can. J. Microbiol.*, 7, 921-932 (1961).
- (26) H. Suzuki: *Arch. Biochem. Biophys.*, 99, 476-483 (1962).
- (27) R. Bourbouze, F. Pratviel-Sosa, and F. Percheron: *Phytochemistry*, 14, 1279-1282 (1975).
- (28) 安田俊隆, 正木和好, 柏木隆史: 日食工誌, 39, 994-1000 (1992).
- (29) T. Yasuda and H. Nakagawa: *Phytochemistry*, 37, 133-136 (1994).
- (30) R. M. C. Dawson, D. C. Elliott, W. H. Elliott, and K. M. Jones: "Data for Biochemical Research," 2nd Ed., Clarendon Press, Oxford, 1969, pp. 448-451.
- (31) 篠山浩文, 安井恒男: 農化, 62, 1339-1343 (1988).
- (32) 安田俊隆, 篠山浩文: 食料工誌, 42, 1012-1018 (1995).
- (33) 岡田茂孝, 板谷公和, 福本寿一郎: 農化, 38, 242-245 (1964).
- (34) H. Shinoyama, Y. Kamiyama, and T. Yasui: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2197-2202 (1988).

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**